家蚕油蚕 *oc* 突变体突变基因的精细定位

殷娅茹，胡 建，胡文波，杨成飞，王 坤，刘 春，
林 英，朱 勇*，王凌燕*

（西南大学生物技术学院，家蚕基因组生物学国家重点实验室，重庆 400716）

摘要：【目的】油蚕 *oc* 突变体是家蚕 *Bombyx mori* 油蚕突变体的一种，经典遗传学连锁图谱已经将 *oc* 突变基因定位在 5 号染色体 40.8 cM 座位。本研究旨在对 *oc* 突变体候选基因进行精细定位并克隆，探究 *oc* 性状形成的分子机制。【方法】以油蚕 *oc* 突变品系和野生型家蚕品系大造(Dz)为亲本，其杂交产生的 F_1 代雄性个体与 *oc* 突变的雌性个体进行回交得到的 1 397 头 BC_1 代个体为定位材料，以家蚕已经报道的基因组序列为参考设计 markers，通过亲本及 F_1 代个体筛选多态性 markers，并利用多态性 markers 和 BC_1 代个体对 *oc* 突变基因进行精细定位。通过半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR(qPCR)筛选 *oc* 紧密连锁区间内的候选基因，确定目标候选基因，继而克隆和测序该基因，分析油蚕 *oc* 突变的原因。【结果】利用 1 397 头 BC_1 代个体和 11 对有效的多态性 markers 将 *oc* 突变基因定位在 M10 与 M11 两个 markers 之间，物理图谱距离大约为 234 kb。通过家蚕基因组数据库对 *oc* 连锁区域内的基因进行检索发现该区域有 5 个预测基因。对这 5 个预测基因在 10 个家蚕品系中进行的表达分析发现，只有 *BGIBMGA*003572 基因在 *oc* 突变个体体壁的表达量明显比正常个体中的低。通过基因的同源分析发现该基因编码的蛋白和人类单羧酸转运蛋白 9(可能的尿酸转运蛋白)是同源蛋白，推测其为 *oc* 突变的候选基因。对 *BGIBMGA*003572 进行的克隆和测序结果显示其编码序列有 5 个氨基酸在 *oc* 突变体中发生了突变。【结论】通过定位克隆，本研究将 *oc* 突变基因定位在了 234 kb 的紧密连锁区间，其中编码单羧酸转运蛋白 9 的 *BGIBMGA*003572 可能和 *oc* 突变体的表型有关。

关键词：家蚕；油蚕突变体；尿酸；*oc* 突变体；精细定位

中图分类号：Q341 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2018)06-0627-10

Fine mapping of mutant gene in the chinese translucent (*oc*) mutant of the silkworm, *Bombyx mori*

YIN Ya-Ru, HU Jian, HU Wen-Bo, YANG Cheng-Fei, WANG Kun, LIU Chun, LIN Ying, ZHU Yong*, WANG Ling-Yan* (State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract:【Aim】The chinese translucent (*oc*) mutant is one of the translucent mutants in the silkworm, *Bombyx mori*. Its responsible gene has been mapped at 40.8 cM on chromosome 5. The purpose of this study is to fine map and clone the candidate gene for *oc* mutation and to explore the molecular mechanism of the *oc* mutant.【Methods】A BC_1 generation was got by hybridizing male F_1 (the mutant strain *oc* × the wild-type strain Dz) with female *oc*. The markers were designed according to reference genomes, and those showing polymorphism between *oc* and Dz were used for the genetic analysis of 1 397 BC_1

基金项目：国家自然科学基金青年基金项目(31401048)；重庆市前沿与应用基础研究计划一般项目(cstc2014jcyjA80007)；中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2017D114)

作者简介：殷娅茹，女，1992 年 3 月生，河南信阳人，硕士研究生，研究方向为动物遗传学，E-mail：chunshenyin@foxmail.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail：wly20080108@swu.edu.cn；zhuy@swu.edu.cn

收稿日期 Received：2017-11-28；接受日期 Accepted：2018-01-18

individuals. The candidate genes in the *oc* tightly linked region were analyzed by semi-quantitative RT-PCR and qPCR, and the target candidate gene was identified, cloned and sequenced. The cause of *oc* mutation was analyzed. 【Results】The *oc* locus was mapped to the 234 kb region between markers M10 and M11 using 1 397 BC_1 individuals and 11 polymorphic markers. There are five predicted protein-coding genes in this region. The expression analysis of the five predicted genes in the integument of ten strains of *B. mori* indicated that only *BGIBMGA*003572 was severely suppressed in the *oc* mutant as compared with in the wild-type strain. The sequence homology analysis indicated that the encoded protein of *BGIBMGA*003572 is homologous to the human monocarboxylate transporter 9, a possible uric acid transporter, which might be the candidate gene for *oc* mutation. The cloning and sequencing results of *BGIBMGA*003572 showed that five amino acids changed in the *oc* mutant as compared with the wild-type strain. 【Conclusion】In this study, the *oc* locus was mapped to the 234 kb region by positional cloning technique, in which *BGIBMGA*003572 encoding a monocarboxylate transporter 9 might contribute to the phenotype of *oc* mutant.

Key words: *Bombyx mori*; translucent mutant; uric acid; *oc* mutant; fine mapping

昆虫在进化中形成了各种各样的体色,绚丽多彩的体色赋予了昆虫优越的环境适应能力,与昆虫觅食、躲避天敌、求偶以及生殖密切相关(True, 2003; Joron *et al.*, 2006; Anstey *et al.*, 2009; Wittkopp and Beldade, 2009)。昆虫的体色根据成因可以分为结构色和色素色(Vukusic, 2006; Shamim *et al.*, 2014),其中色素色是昆虫体色多样性最重要的原因。色素色是由色素物质在昆虫体壁沉积而显现的颜色,色素物质主要包括黑色素、眼色素和喋呤类色素(Shamim *et al.*, 2014)。除此之外,类胡萝卜素(Hirayama *et al.*, 2008)、黄酮类色素(Tabunoki *et al.*, 2002)以及尿酸(Hu *et al.*, 2013)也影响昆虫体色的形成。

家蚕 *Bombyx mori* 是鳞翅目(Lepidoptera)昆虫的模式生物,决定家蚕幼虫体色的主要色素也是黑色素、眼色素和喋呤类色素(Kato *et al.*, 2006; Nie *et al.*, 2014)。除了这些色素外,其体壁中的尿酸盐颗粒对幼虫体色的形成也很重要,有研究报道家蚕幼虫体壁中尿酸含量占整个体壁干重的 11% (Tamura and Sakate, 1983)。家蚕幼虫体壁由于尿酸的积累呈现白色或者不透明。目前报道,大约有 40 多种家蚕品系由于基因突变而导致体壁中的尿酸含量减少,这类突变体被称为油蚕(向仲怀等, 2005)。油蚕突变基因的克隆及研究对了解昆虫尿酸代谢及体色形成机制有重要的意义。通过经典的遗传连锁分析,已经有 20 多个油蚕基因被定位在染色体上(鲁成等, 2003)。随着家蚕基因组测序的完成以及家蚕基因定位克隆技术的成熟,有多种油蚕基因被克隆,并进行了功能分析。尿酸主要在家蚕脂肪体中合成,其中一部分被转运到体壁细胞中储存,另一部分随蚕沙排出体外。从尿酸合成到在体壁细胞积累过程中的每一步出现问题都可能导致家蚕体壁尿酸含量减少,形成油蚕突变体。例如 *oq*, *og* 和 *oya* 突变体是由于脂肪体中的黄嘌呤脱氢酶活性降低或缺失导致尿酸合成减少或者不合成,从而使体壁细胞中尿酸含量减少引起的(Kômoto, 2002; Kômoto *et al.*, 2003; Fujii *et al.*, 2016); $w\text{-}3^{oe}$, *os* 和 *ok* 是由于编码尿酸转运蛋白的基因发生突变引起的(Kômoto *et al.*, 2009; Kiuchi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013b); *ov*, *od*, *ow* 和 *otm* 是由于体壁细胞中尿酸颗粒不能正常形成引起的(Ito *et al.*, 2009; Fujii *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013a; Zhang *et al.*, 2017)。虽然这几个油蚕突变基因已经被克隆,但是家蚕尿酸代谢机制还没有完全阐释。

油蚕 *oc* 突变体又称为中国油蚕(chinese translucent),其基因座位于 5 号染色体 40.8 cM 处(向仲怀等, 2005),其体壁尿酸含量中等且分布均匀(如图 1 所示),是中度油蚕,至今尚未被定位克隆解析其突变原因。日本科学家 Tamura 和 Akai (1990)通过体壁细胞的亚显微结构分析,发现 *oc* 突变体体壁细胞中的尿酸颗粒数量和对照组处于相同水平,但是尿酸颗粒大小比对照组小,他们推测 *oc* 突变体可能是由于尿酸到体壁细胞的运输障碍引起的。为了了解 *oc* 突变体形成的机理,本研究以 *oc* 突变品系和野生型大造(Dz)家蚕品系为亲本,通过杂交产生的 F_1 代雄性个体与 *oc* 突变的雌性个体进行回交得到的 BC_1 代个体作为定位材料,以家蚕已经报道的基因组序列为参考设计 markers,通过亲本

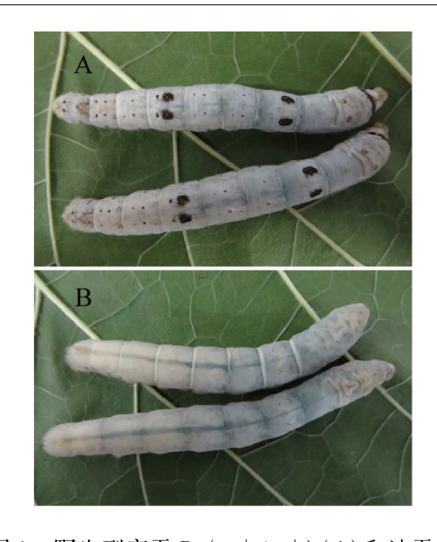


图 1　野生型家蚕 Dz(oc^+/oc^+)(A)和油蚕突变品系 *oc*(*oc/oc*)(B) 5 龄幼虫表型

Fig. 1　Phenotypes of the 5th instar larvae of the wild-type strain Dz (oc^+/oc^+) (A) and the *oc* mutant strain (*oc/oc*) (B) of *Bombyx mori*

及 F_1 代个体筛选多态性 markers，进一步利用多态性 markers 对 *oc* 突变基因进行精细定位。得到其候选基因后，利用生物信息学等方法对候选基因进行鉴定，为后续克隆 *oc* 突变基因及阐明突变机理打下基础。

1　材料与方法

1.1　材料

本研究所用野生型家蚕大造(Dz)和油蚕 *oc*，*oe* 和 *ok* 突变品系以及生产品种 c108 和 872、呆蚕 K31、耐氟品系 T6、Tuerqi(土耳其)、绵茧 Fl 等家蚕品系均由西南大学家蚕基因库提供，它们的基因型分别是：Dz(oc^+/oc^+)，*oc*(*oc/oc*)，*oe*(oc^+/oc^+)，*ok*(oc^+/oc^+)，c108(oc^+/oc^+)，872(oc^+/oc^+)，K31(oc^+/oc^+)，T6(oc^+/oc^+)，Tuerqi(oc^+/oc^+)和 Fl(oc^+/oc^+)。分别按照光周期 12D∶12L 和 25℃ 常规桑叶饲养。

1.2　尿酸含量测定

收集家蚕 Dz 和 *oc* 5 龄第 4 天幼虫的血淋巴，每个品系收集 3 管作为生物学重复，保存于 -80℃ 冰箱备用。解剖家蚕 Dz 和 *oc* 5 龄第 4 天幼虫的体壁(背部第 3 - 8 体节)，去除脂肪体和气管，经过超纯水清洗后，置于玻璃培养皿中，在 90℃ 烘干 3 h。分别将 Dz 和 *oc* 烘干的体壁混合置于 1.5 mL 的离心管中用剪刀剪碎，称取等重量(0.02 g) Dz 和 *oc* 的体壁，分别加入等体积的超纯水，水浴锅煮沸 20 min，常温 12 000 ×g 离心 30 min，吸取上清液。按照上面的方法重复提取沉淀中的尿酸，最后把两次提取的上清液混合并稀释 60 倍用于下一步尿酸含量的测定。每个品系的体壁取样 3 次作为生物学重复。每管血淋巴直接稀释 20 倍用于尿酸的测定。尿酸测定按照尿酸测试试剂盒(BioAssay Systems，美国)的方法进行。

1.3　定位材料的配置

野生型家蚕 Dz 和突变体 *oc* 作为亲本杂交得到 F_1 代，用 F_1 代的雄蛾与突变体 *oc* 的雌蛾进行回交得到 BC_1 代个体作为定位的材料。分别取 100 头 5 龄第 3 天亲本 Dz 和 *oc*，以及 F_1 代保存在 -80℃ 冰箱备用。BC_1 代在 5 龄第 3 天后分辨表型，将正常表型和油蚕表型个体分开保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.4　基因组的提取

家蚕基因组的提取方法按 DNA 自动提取仪(Kurobo-PI1200，日本)提取小鼠尾巴基因组 DNA 提取方案的说明书进行。样品 DNA 溶解在 TE 中，利用分光光度计抽样检测基因组 DNA 浓度和纯度。

1.5　多态性 markers 的筛选及 *oc* 突变基因的定位

以家蚕已经报道的 5 号染色体上的基因组序列为参考(http://silkworm.genomics.org.cn/)，利用 NCBI 引物设计工具 Primer-BLAST(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)设计引物，分别提取 3 头亲本 Dz 和 *oc*，以及 F_1 代个体的基因组 DNA，将它们各自混合后作为模板进行 PCR 扩增反应。PCR 扩增体系(10 μL)：超纯水 5.1 μL，10 × PCR buffer 1 μL，2.5 mmol/L dNTPs 0.8 μL，Taq 酶(TaKaRa)0.1 μL，基因组模板 1 μL，2 μmol/L 引物(F/R)2 μL。扩增条件：94℃ 3 min；94℃ 30 s，55～60℃ 30 s，72℃ 45 s，30～35 个循环；72℃ 终延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，筛选存在产物长度多态性的引物作为多态性 markers 用于连锁分析。

将筛选出来的多态性 marker，以 1 397 头 BC_1 代单头个体的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 反应体系和反应条件同上文中多态性 markers 筛选的体系和条件。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶检测后记录 BC_1 代个体的条带类型。将 BC_1 代正常表型个体中只出现与亲本 *oc* 突变体一样条带的个体视为交换个体，将 BC_1 代突变表型个体中出现与 F_1 代个体一样条带的个体视为交换个体，并将分析结果记录在 Excel 中，按照 markers 之间的距离越近发生交换的概率越小，反之越大，最后构建 *oc* 突变基因的连锁图谱。

1.6 *oc* 突变基因连锁区间内候选基因的分析

利用家蚕基因组数据库 SilkDB（http://silkworm.genomics.org.cn/）对 *oc* 连锁区间内的候选基因进行检索并下载候选基因序列，通过 NCBI 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）的同源比对进一步确定候选基因序列。最后利用在线预测软件 Pfam（http://pfam.xfam.org/search#searchSequenceBlock）对候选基因编码蛋白质的结构域进行预测。

为了比较 *oc* 突变基因连锁区间候选基因表达量的差异，提取 5 龄第 3 天 Dz，*oc*，c108，872，K31，T6，Tuerqi（土耳其），*oe*，*ok* 和 Fl 各品系体壁 RNA，提取方法参照 Triozl（Roche）试剂说明书。利用反转录试剂盒（Promega）对 RNA 进行反转录，合成 cDNA。RT-PCR 体系和条件跟 1.5 节中多态性 markers 筛选的 PCR 体系和条件相同，内参基因为 *BmRpl3*（GenBank 登录号：NM_001043661.1）。内参基因设定 PCR 循环为 25 个循环，候选基因 35 个循环。qPCR 体系（20 μL）：SYBR premix EX Taq Ⅱ 10 μL（TaKaRa），cDNA 模板 2.5 μL，2 μmol/L 引物（F/R）4.0 μL，超纯水 3.5 μL。反应条件：95℃ 预变性 6 min；95℃ 变性 15 s，59℃ 退火 30 s，40 个循环；95℃ 15 s，59℃ 20 s，95℃ 10 s。内参基因为 *BmRpl3*。RT-PCR 和 qPCR 引物见表 1；基因的表达水平采用相对定量的方法，内参基因为 *BmRpl3*（GenBank 登录号：NM_001043661.1），采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法确定目标基因的相对表达倍数绘制图表。

表 1 引物名称和序列

Table 1 List of primers used in this study

引物 Primers	引物序列（5′-3′） Primer sequence	引物用途 Use of primers
3575 F1	AGAACTGAAGTTTCTCCAAGCGT	RT-PCR for *BGIBMGA*003573/4/5
3575 R1	TTCATCCGAGCGTAGTTGATCTC	
3572 F1	GTCAAAAACCCACGGAATTGCTA	RT-PCR for *BGIBMGA*003572
3572 R1	ACACACAGCCAACATAACGAAAG	
3571 F1	GAATCGAAGTGTGCTCCGAAAAT	RT-PCR for *BGIBMGA*003571
3571 R1	TTGAGAGGACATAGAATGCCACG	
BmRpl3 F1	TCGTCATCGTGGTAAGGTCAA	RT-PCR for *BmRpl3*
BmRpl3 R1	TTTGTATCCTTTGCCCTTGGT	
3575 F2	TCAACCAGCGACGAAACAGGC	qPCR for *BGIBMGA*003573/4/5
3575 R2	CGTAGAATGACAGCGACAGCA	
3572 F2	AGCCTTGAGGTCTTTGGTGC	qPCR for *BGIBMGA*003572
3572 R2	CCTATCATGGGTCCGACACT	
3571 F2	TCAGAATAGCGTAGCCTTTG	qPCR for *BGIBMGA*003571
3571 R2	CCACTACAAGCCCTCCAAT	
BmRpl3 F2	CGGTGTTGTTGGATACATTGAG	qPCR for *BmRpl3*
BmRpl3 R2	GCTCATCCTGCCATTTCTTACT	
3572 F3	ACATGTTTGTCGATTGTTTGCG	Cloning of *BGIBMGA*003572
3572 R3	CACGGTGGGAGTTTACCGTAT	

1.7 候选基因 *BGIBMGA*003572 的克隆

从 NCBI 数据库下载 *BGIBMGA*003572 基因（GenBank 登录号：XM_004929982.3）的全长 cDNA 序列，用 NCBI 引物设计工具 Primer-BLAST 在其 5′UTR 区和 3′UTR 区设计引物，利用设计的引物分别扩增 Dz 和 *oc* 中该基因的编码区序列并测序，PCR 体系和条件同 1.5 节，克隆引物见表 1。利用 BioEdit 软件对 *BGIBMGA*003572 编码蛋白的氨基酸序列进行比对，HMMER（http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/）在线软件对其编码蛋白的结构进行预测。

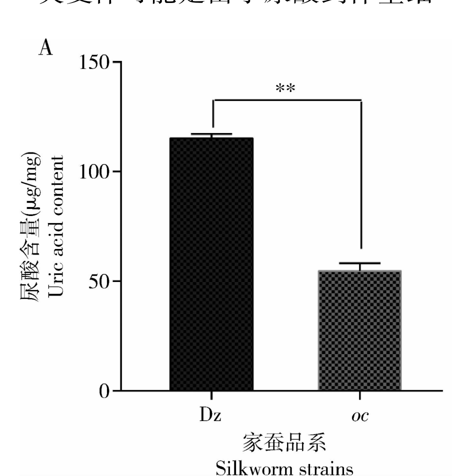
1.8 数据统计分析

数据分析采用 GraphPad Prism 7 软件进行处理分析。尿酸含量和基因表达量测定结果用平均值 ± 标准差（*SD*）表示。野生型 Dz 和油蚕突变品系 *oc* 之间的差异采用 *t* 检验进行多重比较。

2　结果

2.1　体壁和血淋巴中的尿酸含量

Tamura 和 Akai(1990)通过体壁细胞的亚显微结构分析，推测 *oc* 突变体可能是由于尿酸到体壁细胞的运输障碍引起的。本研究对 Dz 和 *oc* 体壁和血淋巴中的尿酸含量进行了测定(图 2)。*oc* 突变体体壁中的尿酸含量比 Dz 中的明显降低，而在血淋巴中，两者中的尿酸含量没有明显差异，这提示在 *oc* 突变体中尿酸合成途径可能是正常的，而尿酸从血淋巴到体壁细胞的运输过程可能出现了问题。



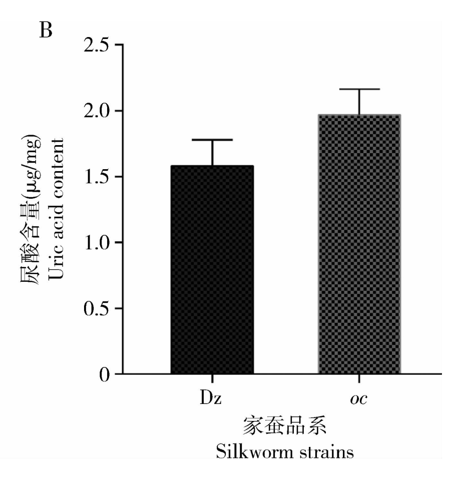


图 2　野生型家蚕 Dz 和油蚕突变品系 *oc* 5 龄 4 天幼虫体壁(A)和血淋巴(B)中的尿酸含量

Fig. 2　Uric acid content in the integument (A) and hemolymph (B) of day 4 5th instar larvae of the wild-type strain Dz and the *oc* mutant strain of *Bombyx mori*

图中数据为平均值 ± *SD* (n = 3)。Data in the figure are mean ± *SD* (n = 3). ** 差异极显著 Extremely significant difference ($P < 0.01$)(*t* 检验 *t*-test).

2.2　多态性 markers 的筛选

本研究一共设计了 189 对引物用于多态性 markers 的筛选，最后通过亲本之间 PCR 产物长度多态性筛选出 11 个多态性 markers 用于 *oc* 突变基因的连锁分析，其中 3 个多态性 markers 位于 nscaf2838 上，8 个多态性 markers 位于 nscaf2674 上(表 2)。

2.3　*oc* 突变基因的精细定位

本研究首先用 144 个 BC_1 代个体和 6 个 markers 将 *oc* 突变基因定位在了 M6 和 M4 两个 marker 之间，物理距离约为 1.806 Mb(图 3：A)。为了进一步缩小 *oc* 突变基因的连锁区域，进一步在 M6 和 M4 两个 markers 之间筛选新的 markers。最后总共使用 1 397 个 BC_1 代个体将 *oc* 突变基因定位在 M10 与 M11 两个 markers 之间，物理距离约为 234 kb，如图 3(B)所示。

表 2　油蚕突变品系 *oc* 突变基因连锁分析多态性 markers

Table 2　Polymorphic markers used in the linkage analysis for the *oc* mutant of *Bombyx mori*

编号 Code	正向(5′-3′) Forward	反向(5′-3′) Reverse	位置(bp) Position
M1	ATACTAGCTCAACTGTCGTATC	CCCTACTAACAATTCATTACGC	nscaf2838, 298 863 - 299 937
M2	CATCATGGAGAGCAGTTAAATC	CAATACAGACAATATCAGTGGC	nscaf2838, 1 286 112 - 1 287 294
M3	ACGTGGATGGTATCCTTGTTTGA	CTCTTAAATCTGTGCGGTAAGCG	nscaf2838, 254 6087 - 2 547 226
M4	CTAGAAACGGTAGGAGTAGTCGC	CATCGTCCGTGAAACGTAATCAG	nscaf2674, 2 619 344 - 2 619 963
M5	GCTAGATCGTTCAAGCGGTAGTA	TGAAACCGAACGTCACTTGAATG	nscaf2674, 7 477 943 - 7 478 889
M6	GTATTGGATTCGTGAAGAGCGTG	GTGAACACGGTTGGAATTAAGCA	nscaf2674, 339 751 - 340 716
M7	GTTATCGCTTCAGCCAATCTTCC	CCTTGATACGCGAGGTCAAAATC	nscaf2674, 1 330 200 - 1 330 984
M8	CGTGACACAGGCTATAATCGGTA	CCACGTAATTTGCGCTGTAGTAG	nscaf2674, 2 144 914 - 2 145 663
M9	GGTAAAGAACTCGCAAGCCATATC	ATTGCTCCCAAGTCTGACACTATT	nscaf2674, 1 826 925 - 1 827 477
M10	TGACAAATTACTCGAAGCGTTGA	TTTGCCGGATTATACAACTGGTC	nscaf2674, 1 422 129 - 1 423 190
M11	AACCTGTCTCAAACGCATTCTAG	GGTTGCATTTGGTCCATACAAAC	nscaf2674, 1 655 720 - 1 657 057

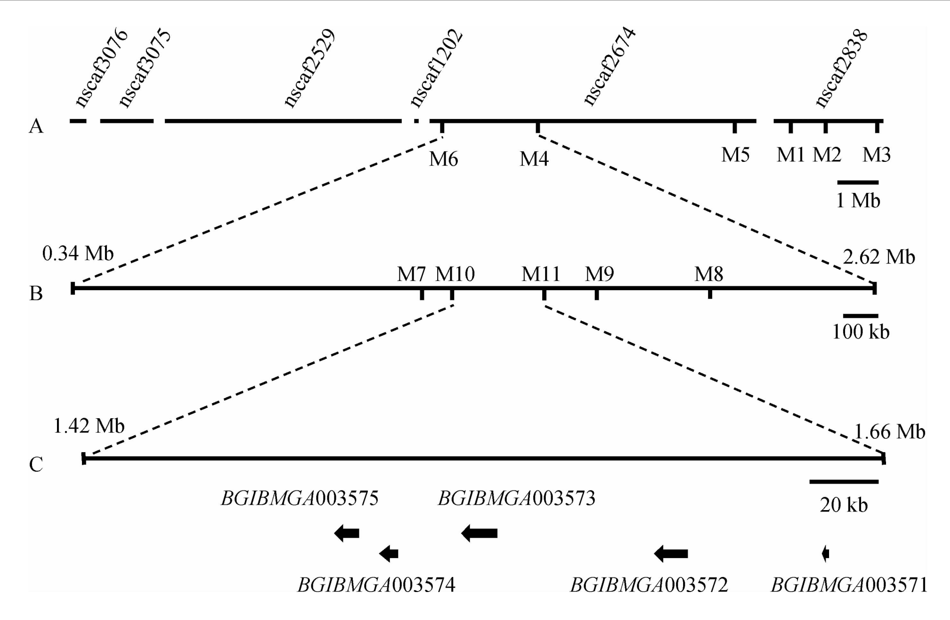


图 3　油蚕突变品系 *oc* 突变基因的精细定位图

Fig. 3　Fine mapping of the candidate genes for *oc* mutation in *Bombyx mori*

A：初定位所用的 markers（Markers used for the low-density linkage map）；B：精细定位所用的 markers（Markers used for the high-density linkage map）；C：*oc* 紧密连锁区间候选基因 *BGIBMGA*003575，*BGIBMGA*003574，*BGIBMGA*003573，*BGIBMGA*003572 和 *BGIBMGA*003571（Predicted candidate genes *BGIBMGA*003575，*BGIBMGA*003574，*BGIBMGA*003573，*BGIBMGA*003572 and *BGIBMGA*003571 in the *oc* tightly linked region）.

2.4　*oc* 突变基因连锁区间候选基因的分析及鉴定

利用家蚕基因组数据库 SilkDB 对 *oc* 连锁区间内的基因进行检索，发现这个区间有 5 个预测基因，分别是 *BGIBMGA*003575（GenBank 登录号：XM_012693714.2），*BGIBMGA*003574（GenBank 登录号：XM_012693714.2），*BGIBMGA*003573（GenBank 登录号：XM_012693710.2），*BGIBMGA*003572（GenBank 登录号：XM_004929982.3）和 *BGIBMGA*003571（GenBank 登录号：XM_012693712.2）。候选基因在家蚕基因组数据库中的基因注释和其在 NCBI 数据库中的同源比对结果显示 *BGIBMGA*003575 和 *BGIBMGA*003574 编码同一个蛋白，被注释为弹性蛋白，*BGIBMGA*003573 编码蛋白也被注释为弹性蛋白，我们将 *BGIBMGA*003573 编码的蛋白序列和 *BGIBMGA*003575 编码的蛋白序列进行比对发现两者的蛋白序列相同；将家蚕基因组数据库 SilkDB 中 *BGIBMGA*003575，*BGIBMGA*003574 和 *BGIBMGA*003573 的 CDS 序列放到日本家蚕数据库 SilkBase（http：//silkbase.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi）中进行检索，发现这 3 个序列都比对到 *KWMTBOM*002966（日本家蚕数据库中的编号）基因上，这揭示 *BGIBMGA*003575，*BGIBMGA*003574 和 *BGIBMGA*003573 编码同一个蛋白。弹性蛋白主要位于内质网膜和高尔基体上，具有运输小泡的功能（陈全梅等，2011）；*BGIBMGA*003572 编码一个单羧酸转运蛋白 9 的蛋白，在人类肠道中可能参与了尿酸的排泄（Nakayama *et al*.，2013）；*BGIBMGA*003571 编码一个单羧酸转运蛋白 1 的蛋白，在人体各组织中普遍存在，负责单羧酸转运（曾军英等，2008）。通过在线预测软件 Pfam 对候选基因编码蛋白质的结构域进行预测，结果如表 3 所示。

表 3　油蚕突变品系 *oc* 连锁区间候选基因编码蛋白质的结构域分析

Table 3　Domain analysis of the encoding proteins of the candidate genes in the *oc* mutant locus linkage region

基因 Gene	蛋白名称 Protein name	氨基酸数 Number of amino acids	结构域 Domain	蛋白注释 Protein annotation
*BGIBMGA*003573/4/5	BmATL	745	鸟苷酸结合结构域 Guanylate binding protein（GBP）	弹性蛋白 Atlastin
*BGIBMGA*003572	BmMCT9	547	12 个跨膜结构域 Twelve transmembrane domains（TM）	单羧酸转运蛋白 9 Monocarboxylate transporter 9
*BGIBMGA*003571	BmMCT1	397	10 个跨膜结构域 Ten transmembrane domains（TM）	单羧酸转运蛋白 1 Monocarboxylate transporter 1

本研究对 Dz 和 *oc* 血淋巴及体壁中的尿酸含量进行了测定，结果提示 *oc* 突变体可能是由于尿酸从血淋巴到体壁细胞运输问题。Tamura 和 Akai (1990) 曾推测，*oc* 突变体可能是由于尿酸不能转运到体壁细胞导致的突变。为了确定 *oc* 突变的靶基因，对 *oc* 候选基因在 Dz 和 *oc* 幼虫体壁中的表达量进行了分析。RT-PCR(图 4)和 qPCR(图 5)结果都显示，*BGIBMGA*003572 在 *oc* 幼虫体壁中的表达量显著性低于 Dz 中的表达量，而其他 3 个基因的表达量在两者间没有显著性差异。为了验证 *BGIBMGA*003572 在 *oc* 幼虫体壁中表达量的降低是 *oc* 突变体所特有的，利用另外 8 个家蚕品系(包括两个油蚕突变体 *oe* 和 *ok*)对 *BGIBMGA*003572 的表达量进行了分析，如图 6 所示。*BGIBMGA*003572 的表达在其他几个品系中没有受到沉默，说明 *BGIBMGA*003572 的低表达可能是 *oc* 突变体特有的。据此推测 *BGIBMGA*003572 基因表达量的降低和 *oc* 突变体的表型有关，*BGIBMGA*003572 拟是导致 *oc* 突变的候选基因之一。

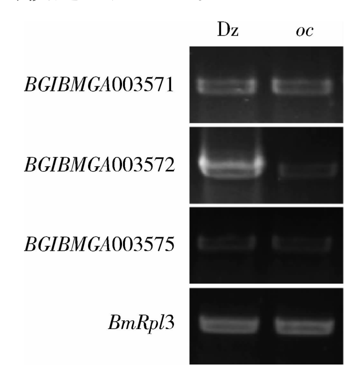


图 4　油蚕突变品系 *oc* 突变候选基因的 RT-PCR 分析

Fig. 4　RT-PCR analysis of the candidate genes for *oc* mutation in *Bombyx mori*

*BGIBMGA*003575，*BGIBMGA*003572 和 *BGIBMGA*003571 为候选基因。*BGIBMGA*003575，*BGIBMGA*003572 and *BGIBMGA*003571 are candidate genes.

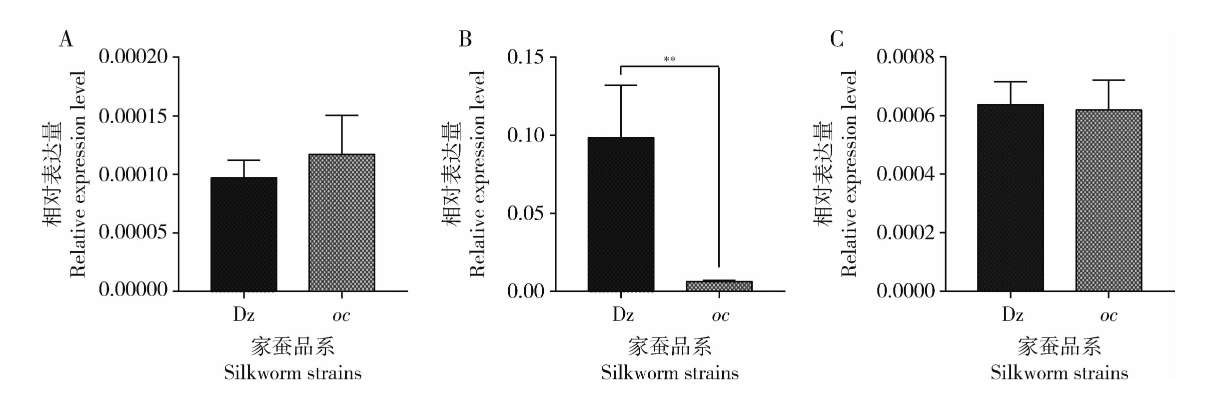


图 5　油蚕突变品系 *oc* 突变候选基因的 qPCR 分析

Fig. 5　qPCR analysis of the candidate genes for *oc* mutation in *Bombyx mori*

A：*BGIBMGA*003571；B：*BGIBMGA*003572；C：*BGIBMGA*003573/4/5. 图中数据为平均值 ± *SD* (n = 3)。Data in the figure are mean ± *SD* (n = 3). ** 差异极显著 Extremely significant difference ($P < 0.01$)(*t* 检验 *t*-test).

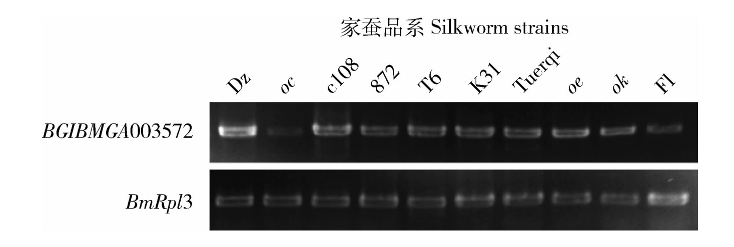


图 6　半定量 PCR 检测 *BGIBMGA*003572 在不同家蚕品系体壁中的表达特征

Fig. 6　Expression pattern of *BGIBMGA*003572 in the integument of different strains of *Bombyx mori* detected by semi-quantitative PCR

2.5　候选基因 *BGIBMGA*003572 的克隆

为了对候选基因 *BGIBMGA*003572 进一步分析，克隆 *BGIBMGA*003572 编码区的 cDNA 序列，结果显示 *BGIBMGA*003572 编码区可推测出 544 个氨基酸。HMMER 在线软件预测 *BGIBMGA*003572 编码的蛋白有 12 个跨膜区，其中前 6 个跨膜区属于主要协助转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)结构域和 12 个跨膜区(邓东和颜宁，2015)。进一

步通过比对 *oc* 突变体和对照 Dz 的 *BGIBMGA*003572 编码的氨基酸序列发现，在 *oc* 突变体中，有 5 个氨基酸发生了变化，分别是：第 47 位氨基酸由苯丙氨酸变成了异亮氨酸，第 241 位氨基酸由丙氨酸变成了苏氨酸，第 242 位氨基酸由丝氨酸变成了丙氨酸，第 536 位氨基酸由赖氨酸变成了天冬氨酸，第 538 位氨基酸由谷氨酸变成了谷丙酰胺（图 7）。通过 MFS 及跨膜结构域序列比对发现，这几个突变位点都不包含在跨膜结构域中，它们在 *oc* 突变体中的改变是否对 *BGIBMGA*003572 的功能产生影响还有待进一步研究。

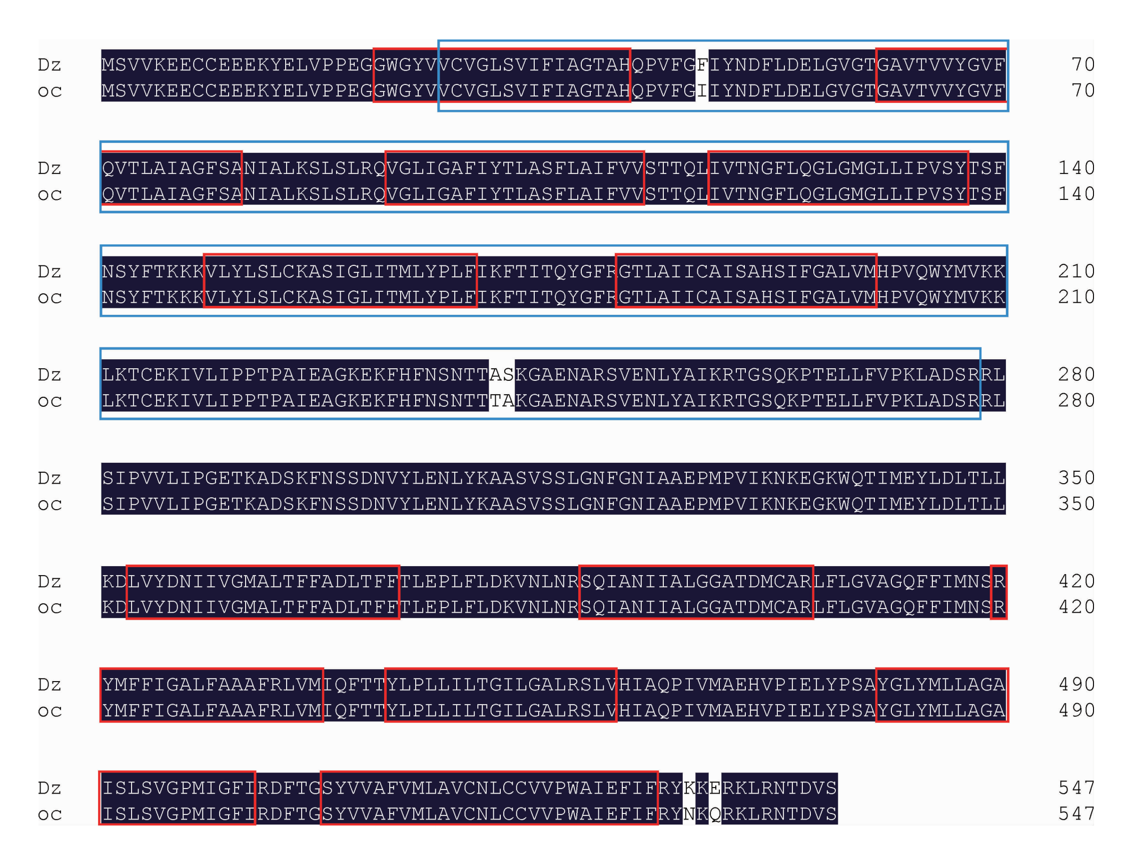


图 7 野生型家蚕 Dz 和油蚕突变品系 *oc* 的 *BGIBMGA*003572 基因编码蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 7 Amino acid sequence alignment of *BGIBMGA*003572 from the wild-type strain Dz and the *oc* mutant strain of *Bombyx mori*

红色框表示跨膜结构域，蓝色框表示 MFS 结构域。The red box indicates the transmembrane domain and the blue box indicates the MFS domain.

3 讨论

本研究主要通过基于 PCR 产物多态性 markers 的定位克隆，将 *oc* 突变基因定位在了 M10 和 M11 两个 markers 之间，物理距离约为 234 kb。对这个区域内的基因进行检索发现，该区间有 5 个预测基因：*BGIBMGA*003575，*BGIBMGA*003574，*BGIBMGA*003573，*BGIBMGA*003572 和 *BGIBMGA*003571。通过序列同源性比对发现 *BGIBMGA*003575，*BGIBMGA*003574 和 *BGIBMGA*003573 编码同一个蛋白，功能注释是 atlastin，与人类遗传性痉挛性截瘫（hereditary spastic paraplegia，HsP）疾病有关（陈全梅等，2011）。*BGIBMGA*003572 和 *BGIBMGA*003571 编码的蛋白分别被注释为单羧酸转运蛋白 9（monocarboxylate transporter 9，MCT9）和单羧酸转运蛋白 1（monocarboxylate transporter 1，MCT1）。2013 年，Nakayama 等发现 MCT9 的错义突变可能会造成肠道对尿酸的排泄减少，从而导致肾脏超负荷痛风（Nakayama *et al.*，2013）。这说明 MCT9 有可能在人类尿酸排泄过程中参与了尿酸的转运。另外，Kiuchi 等（2011）发现伴性油蚕 *os* 突变是由一个编码氨基酸转运蛋白的基因发生突变导致的。单羧酸转运蛋白和氨基酸转运蛋白都属于溶脂载体（solute-carrier，SCL）家族（Kiuchi *et al.*，2011；Nakayama *et al.*，2013）。因此我们推测 *BGIBMGA*003572 是 *oc* 突变体的候选基因之一。血淋巴和体壁中尿酸含量的测定结果显示 *oc* 突变体可能是由于尿酸从血淋巴

转运到体壁细胞这一过程出现了问题，检测 *BGIBMGA*003572 在体壁中的表达情况，结果发现其表达量在 *oc* 中显著降低；克隆 *BGIBMGA*003572 编码区进行测序分析，发现在 *oc* 中 *BGIBMGA*003572 编码的蛋白序列有 5 个氨基酸发生了改变，这几个突变位点都不包含在跨膜结构域中。MCT9 在人体的多个排泄器官中都有表达，包括肠和肾脏，虽然 Nakayama 等(2013)的研究已经发现 MCT9 的突变有可能和肠道对尿酸的排泄减少有关，但至今仍没有确定 MCT9 是一个尿酸转运蛋白。因此，下一步我们将通过转基因等手段对 *BGIBMGA*003572 的功能进行验证，确认该基因是否是导致 *oc* 突变体体壁细胞中尿酸含量降低的原因，并在细胞水平上确认该基因编码的蛋白是否具有转运尿酸的功能。

综上所述，本研究通过对 *oc* 突变基因的精细定位，将其连锁区间定位在家蚕 5 号染色体 nscaf2674 的 1 423 190 ~ 1 657 057 bp 之间，该区间物理距离大约 234 kb，有 5 个预测基因。其中编码单羧酸转运蛋白 9 的 *BGIBMGA*003572 在 *oc* 突变体中的表达量显著降低。*oc* 突变体的表型可能和 *BGIBMGA*003572 的沉默有关。这些结果为进一步研究 *oc* 突变形成的分子机制奠定了实验基础。

参考文献（References）

Anstey ML, Rogers SM, Ott SR, Burrows M, Simpson SJ, 2009. Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts. *Science*, 323(5914): 627 – 630.

Chen QM, Tan X, Yang Q, Hu XM, Ma ZG, Zhao P, 2011. Identification and expression pattern of *Atlastin* genes in silkworm. *Sci. Seric.*, 37(2): 206 – 214. [陈全梅, 谭祥, 杨强, 胡晓明, 马振刚, 赵萍, 2011. 家蚕 *Atlastin* 基因(*BmATL*)的鉴定及表达模式. 蚕业科学, 37(2): 206 – 214]

Deng D, Yan N, 2015. Structural basis and transport mechanism of MFS superfamily transporter. *Chin. Sci. Bull.*, 60(8): 720 – 728. [邓东, 颜宁, 2015. MFS 超家族转运蛋白结构基础及转运机制. 科学通报, 60(8): 720 – 728]

Fujii T, Daimon T, Uchino K, Banno Y, Katsuma S, Sezutsu H, Tamura T, Shimada T, 2010. Transgenic analysis of the *BmBLOS2* gene that governs the translucency of the larval integument of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 19(5): 659 – 667.

Fujii T, Yamamoto K, Banno Y, 2016. Molybdenum cofactor deficiency causes translucent integument, male-biased lethality, and flaccid paralysis in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 73: 20 – 26.

Hirayama C, Ono H, Tamura Y, Konno K, Nakamura M, 2008. Regioselective formation of quercetin 5-o-glucoside from orally administered quercetin in the silkworm, *Bombyx mori*. *Phytochemistry*, 69(5): 1141 – 1149.

Hu YG, Shen YH, Zhang Z, Shi GQ, 2013. Melanin and urate act to prevent ultraviolet damage in the integument of the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem.*, 83(1): 41 – 55.

Ito K, Katsuma S, Yamamoto K, Okuda KK, Mita K, Shimada T, 2009. A 25 bp-long insertional mutation in the *BmVarp* gene causes the waxy translucent skin of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 39(4): 287 – 293.

Joron M, Papa R, Beltrán M, Chamberlain N, Mavárez J, Baxter S, Abanto M, Bermingham E, Humphray SJ, Rogers J, Beasley H, Barlow K, ffrench-Constant RH, Mallet J, McMillan WO, Jiggins CD, 2006. A conserved supergene locus controls colour pattern diversity in heliconius butterflies. *PLoS Biol.*, 4(10): 1831 – 1840.

Kato T, Sawada H, Yamamoto T, Mase K, Nakagoshi M, 2006. Pigment pattern formation in the quail mutant of the silkworm, *Bombyx mori*: parallel increase of pteridine biosynthesis and pigmentation of melanin and ommochromes. *Pigm. Cell Res.*, 19(4): 337 – 345.

Kiuchi T, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, 2011. Mutations in an amino acid transporter gene are responsible for sex-linked translucent larval skin of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 41(9): 680 – 687.

Kômoto N, 2002. A deleted portion of one of the two xanthine dehydrogenase genes causes translucent larval skin in the mutant of the silkworm (*Bombyx mori*). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 32(6): 591 – 597.

Kômoto N, Quan GX, Sezutsu H, Tamura T, 2009. A single-base deletion in an ABC transporter gene causes white eyes, white eggs, and translucent larval skin in the silkworm *w-3^{oe}* mutant. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 39(2): 152 – 156.

Kômoto N, Sezutsu H, Yukuhiro K, Banno Y, Fujii H, 2003. Mutations of the silkworm molybdenum cofactor sulfurase gene, *og*, cause translucent larval skin. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 33(4): 417 – 427.

Lu C, Dai FY, Xiang ZH, 2003. Studies on the mutation strains of the *Bombyx mori* gene bank. *Sci. Agric. Sin.*, 36(8): 968 – 975. [鲁成, 代方银, 向仲怀, 2003. 家蚕基因库突变系统的研究. 中国农业科学, 36(8): 968 – 975]

Nakayama A, Matsuo H, Shimizu T, Ogata H, Takada Y, Nakashima H, Nakamura T, Shimizu S, Chiba T, Sakiyama M, Ushiyama C, Takada T, Inoue K, Kawai S, Hishida A, Wakai K, Hamajima N, Ichida K, Sakurai Y, Kato Y, Shimizu T, Shinomiya N, 2013. A common missense variant of monocarboxylate transporter 9 (*MCT9*/*SLC16A9*) gene is associated with renal overload gout, but not with all gout susceptibility. *Hum. Cell*, 26(4): 133 – 136.

Nie HY, Liu C, Cheng TC, Li QY, Wu YQ, Zhou MT, Zhang YX, Xia QY, 2014. Transcriptome analysis of integument differentially expressed genes in the pigment mutant (*quail*) during molting of silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 9(4): e94185.

Shamim G, Ranjan SK, Pandey DM, Ramani R, 2014. Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. *Eur. J. Entomol.*, 111(2):

149 – 164.

Tabunoki H, Sugiyama H, Tanaka Y, Fujii H, Banno Y, Jouni ZE, Kobayashi M, Sato R, Maekawa H, Tsuchida K, 2002. Isolation, characterization, and cDNA sequence of a carotenoid binding protein from the silk gland of *Bombyx mori* larvae. *J. Biol. Chem.*, 277 (35): 32133 – 32140.

Tamura T, Akai H, 1990. Comparative ultrastructure of larval hypodermal cell in normal and oily *Bombyx* mutants. *Cytologia*, 55 (3): 519 – 530.

Tamura T, Sakate S, 1983. Relationship between the expression of oily character and uric acid incorporation in the larval integument of various oily mutants of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bull. Seric. Exp. Sta.*, 28(6): 719 – 740.

True JR, 2003. Insect melanism: the molecules matter. *Trends Ecol. Evol.*, 18(12): 640 – 647.

Vukusic P, 2006. Structural colour in Lepidoptera. *Curr. Biol.*, 16 (16): 621 – 623.

Wang LY, Kiuchi T, Fujii T, Daimon T, Li MW, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, 2013a. Reduced expression of the dysbindin-like gene in the *Bombyx mori ov* mutant exhibiting mottled translucency of the larval skin. *Genome*, 56(2): 101 – 108.

Wang LY, Kiuchi T, Fujii T, Daimon T, Li MW, Banno Y, Kikuta S, Kikawada T, Katsuma S, Shimada T, 2013b. Mutation of a novel ABC transporter gene is responsible for the failure to incorporate uric acid in the epidermis of *ok* mutants of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 43(7): 562 – 571.

Wittkopp PJ, Beldade P, 2009. Development and evolution of insect pigmentation: genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 20(1): 65 – 71.

Xiang ZH, Hang JT, Xia JG, Lu C, 2005. Biology of Sericulture. China Forestry Press, Beijing. 125 – 132. [向仲怀, 黄君霆, 夏建国, 鲁成, 2005. 蚕丝生物学. 北京: 中国林业出版社. 125 – 132]

Zeng JY, Han XF, Tan ZL, 2008. Monocarboxylic acid transporter family and its biological function. *Chem. Life*, 28(4): 33 – 36. [曾军英, 韩雪峰, 谭支良, 2008. 单羧酸转运蛋白家族及其生物学功能. 生命的化学, 28(4): 33 – 36]

Zhang HK, Kiuchi T, Wang LY, Kawamoto M, Suzuki Y, Sugano S, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, 2017. Bm-muted, orthologous to mouse muted and encoding a subunit of the BLOC-1 complex, is responsible for the *otm* translucent mutation of the silkworm *Bombyx mori*. *Gene*, 629: 92 – 100.

（责任编辑：马丽萍）